

# Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby

Nonalcoholic fatty liver disease

Tomasz Mach

Katedra Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Zakaźnych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Przegląd Gastroenterologiczny 2007; 2 (2): 101–105

**Słowa kluczowe:** stłuszczenie wątroby, niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby, niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby.

**Key words:** fatty liver, nonalcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis..

**Adres do korespondencji:** prof. dr hab. n. med. Tomasz Mach, Katedra Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Zakaźnych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Śniadeckich 5, 31-501 Kraków, tel. +48 12 424 73 40, tel./faks +48 12 424 73 80, e-mail: tmach@su.krakow.pl

## Streszczenie

Stłuszczenie wątroby należy do najczęstszych patologii tego narządu. Głównymi czynnikami etiologicznymi tego schorzenia są: alkohol, zaburzenia metaboliczne, w tym otyłość, cukrzyca, hiperlipidemia i leki. W niniejszym artykule opisano niealkoholową stłuszczeniową chorobę wątroby, która często towarzyszy zaburzeniom metabolicznym, oraz niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby, które może prowadzić do marskości wątroby. Objawy kliniczne tych chorób są bardzo niecharakterystyczne lub nie występują, a podstawowe znaczenie w ich rozpoznawaniu mają badania laboratoryjne i obrazowe wątroby. Leczenie niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby obejmuje eliminację czynnika wywołującego, a niektóre leki mają działanie wspomagające. Choroba ta powinna być starannie rozpoznana, gdyż nieleczone może prowadzić do marskości wątroby i jej następstw.

Stłuszczenie wątroby (SW) jest procesem patologicznym spowodowanym nadmiernym nagromadzeniem tłuszczu w komórkach wątrobowych w odpowiedzi na działanie czynnika uszkadzającego. Wprowadzenie do rutynowej diagnostyki badań USG zwiększyło częstość rozpoznawania tej choroby, a wraz z rozwojem badań nad patogenezą cukrzycy, otyłości czy zespołu metabolicznego znacznie wzrosło zainteresowanie SW. W efekcie badań i obserwacji klinicznych wprowadzono jednoznaczny podział na alkoholowe i niealkoholowe SW oraz nową terminologię [1–5].

Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (ang. *nonalcoholic fatty liver disease* – NAFLD) obejmuje trzy jednostki chorobowe: proste SW, SW powikłane procesem zapalnym, określane jako niealkoholowe stłuszcze-

## Abstract

Fatty liver is a very frequent pathologic condition of the liver. The main aetiological factors are: alcohol, metabolic disorders including obesity, diabetes mellitus, hyperlipidaemia, drugs and others. We present nonalcoholic fatty liver disease, which is a frequent complication of metabolic diseases and nonalcoholic steatohepatitis, which can lead to liver cirrhosis. The symptoms are uncharacteristic or lacking; the diagnosis is based on biochemical liver tests and liver visualization tools. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease includes elimination of aetiological factors; some drugs play a supportive role. The disease should be thoroughly diagnosed, because if not treated it can lead to liver cirrhosis with further complications.

niowe zapalenie wątroby (ang. *non-alcoholic steatohepatitis* – NASH), oraz marskość towarzyszącą NAFLD [2]. NASH opisali po raz pierwszy Ludwig i wsp. z Kliniki Mayo w 1980 r. jako przewlekłe zapalenie wątroby ze zmianami histologicznymi przypominającymi alkoholową chorobę wątroby, która występuje u osób nienadużywających alkoholu [6]. Zainteresowanie tymi chorobami w ostatnich latach rośnie, ponieważ są bardzo często rozpoznawane u osób otyłych (NAFLD nawet u 80% chorych), a także dlatego, że mogą prowadzić do marskości i jej powikłań, w tym pierwotnego raka wątroby [2, 5–8]. Rozpoznawana przed laty tzw. marskość kryptogenna była spowodowana, wg obecnych poglądów, właśnie przez NAFLD.

Obraz kliniczny i patologiczny NAFLD przypomina alkoholowe SW, lecz NAFLD rozpoznajemy u chorego, któ-

**Tabela I.** Przyczyny niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby

**Table II.** *Etiology of nonalcoholic fatty liver disease*

<b>Oporność na insulinę</b>
zespół metaboliczny: otyłość, cukrzyca, hiperlipidemia, nadciśnienie tętnicze
zanik tkanki tłuszczowej ( <i>lipodystrofia</i> )
zespół Mauriacca
<b>Zaburzenia metabolizmu lipidów</b>
abetalipoproteinemia
hypobetalipoproteinemia
choroba Andersena
zespół Webera-Christiana
<b>Całkowite żywienie parenteralne</b>
<b>Znaczna utrata wagi</b>
zespoleń krętniczo-czecz
zespoleń żółdkowe
ciężkie głodzenie
<b>Jatrogenne</b>
amiodaron, diltiazem, tamoksifen, sterydy, terapia antyretrowirusowa
<b>Ekspozycja na substancje toksyczne</b>
środowiskowa
w miejscu pracy

ry nie nadużywa alkoholu [1, 3]. Istnieje ścisła zależność pomiędzy otyłością a występowaniem NAFLD. Ponieważ częstość otyłości na świecie zwiększa się (w USA ok. 30%, w Polsce ok. 25% osób cierpi na otyłość), równolegle rośnie częstość zachorowań na NAFLD [4, 5, 8, 9]. Według jednych autorów NAFLD występuje u 10–30% (średnio 20%) populacji ogólnej [5, 8, 10], wg innych aż u 80% osób otyłych [2]. NAFLD stanowi więc obecnie najczęstszą chorobę wątroby w krajach rozwiniętych [7–9].

NAFLD jest chorobą o łagodnym przebiegu, jednak u ok. 15–20% chorych prowadzi do NASH, która z kolei u ok. 20% chorych może ulegać progresji do marskości wątroby i zgonu z powodu powikłań, w tym u ok. 10% przypadków raka pierwotnego wątroby [4, 5, 7, 8, 11]. Zachorowania na NAFLD stwierdza się w każdym wieku [2, 7–9, 11].

### Etioopatogeneza i czynniki ryzyka

Patogeneza NAFLD i NASH nie jest wyjaśniona. Kluczową rolę w rozwoju tych chorób odgrywają dwa czynniki: insulinooporność i stres oksydacyjny z peroksydacją lipidów. Insulinooporność zmienia metabolizm lipidów przez zwiększenie lipolizy w tkankach obwodowych chorego, zwiększenie syntezy trójglicerydów i wychwytu wątrobowego wolnych kwasów tłuszczowych [2, 4, 5, 12]. Według dwuetapowej hipotezy powstawania NASH, pierwszym etapem jest gromadzenie tłuszczu w hepato-

**Tabela II.** Objawy kliniczne niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby

**Table II.** *Clinical symptoms of nonalcoholic fatty liver disease*

<b>Wywiad</b>
brak nadużywania alkoholu, leków, narażenia na toksyny i czynniki infekcyjne, chorób wątroby
<b>Objawy podmiotowe</b>
najczęściej brak objawów
chory może zgłaszać: zmęczenie, osłabienie, złe samopoczucie, uczucie dyskomfortu w prawym górnym kwadrancie brzucha
<b>Objawy przedmiotowe</b>
powiększenie wątroby, splenomegalia, rzadko cechy nadciśnienia wrotnego
<b>Odchylenia w badaniach laboratoryjnych</b>
zwiększona aktywność ALT, AST, współczynnik de Ritis AST/ALT <1 (w chorobach alkoholowych >1)
GGTP, bilirubina – rzadko podwyższone
nieprawidłowy lipidogram (25–75% chorych), podwyższona glukoza (często), obniżona albumina, wydłużony czas protrombinowy
nieprawidłowe wyniki badań żelaza (niekiedy podwyższone żelazo, ferrytyna i saturacja transferyny), brak markerów WZW, brak autoprzeciwciał (niskie ANA, poniżej 1:320)
<b>Odchylenia w badaniach obrazowania</b>
USG: powiększona wątroba z podwyższonym echogramem (stłuszczenie wątroby), objawy nadciśnienia wrotnego ze splenomegalią (rzadko)
<b>Biopsja wątroby</b>
stłuszczenie grubokropelkowe hepatocytów, nacieki zapalne z komórek jedno- i wielojądrzastych, zwyrodnienie balonowate hepatocytów, rozsiana martwica, zwłóknienie, ciątka Mallory'ego

cytach spowodowane insulinoopornością, powodujące rozwój SW, a drugim etapem – stres oksydacyjny powodujący peroksydację lipidów i aktywację cytokin zapalnych wywołujących NASH [8–10, 12]. Czynniki etiologiczne SW są bardzo liczne, przyczyny NAFLD przedstawiono w tabeli I [2, 9, 11–13].

Oporność na insulinę w NAFLD jest ściśle związana z rozwojem choroby, chociaż nie została w pełni wyjaśniona; pod uwagę brane są takie czynniki, jak nieprawidłowe gromadzenie tłuszczu trzewnego, nadmiar wolnych kwasów tłuszczowych, nieprawidłowości w lipoproteinach i pierwotne uszkodzenie wątroby [2, 4, 5, 12, 13]. Oporność na insulinę u chorych z NAFLD może być zwiększona przez kilka ważnych mediatorów peptydowych wydzielanych przez adipocyty, np. TNF- $\alpha$ , leptynę i adiponektynę [2]. Dodatkowa ekspozycja na lipopolisacharydy, niektóre hepatotoksyny lub czynniki zakaźne może prowadzić u chorych z NAFLD do rozwoju marskości [2, 8, 13]. Bakteryjne endotoksyny i lipopolisacharydy stymulują wydzielanie w wątrobie cytokin prozapalnych, m.in. TNF- $\alpha$  i interleukin (IL-6 i IL-8), które aktywują odpowiedź zapalną [2]. U chorych z NASH wykazano podwyższony poziom TNF- $\alpha$  i większy przerost bakteryjny jelit [7, 8]. Nadmiar bakterii jelitowych stwierdzono u chorych po operacji omijającej (*jeuno-ileal by-pass*), z uchyłkowatością jelit, leczonych odżywianiem parenteralnym, z cukrzycą, które to stany prowadzą do rozwoju NAFLD i NASH [2, 7, 8]. Inne brane pod uwagę czynniki dotyczą zmniejszenia motoryki jelita, nadmiernego spożywania wodorowęglanów, nieprawidłowości w rozwoju jelitowej tkanki limfatycznej w młodości oraz polimorfizmu genu TNF- $\alpha$  [2, 8].

## Rozpoznanie

Objawy kliniczne i laboratoryjne NAFLD przedstawiono w tabeli II. NAFLD przebiega bezobjawowo u 48–100% chorych [2]. Niektórzy chorzy mogą zgłaszać: zmęczenie, osłabienie, pogorszenie samopoczucia oraz uczucie dyskomfortu w okolicy prawego podżebrza. U ok. 75% chorych badaniem przedmiotowym można stwierdzić powiększoną wątrobę, rzadziej (ok. 25% przypadków) śledzionę, niekiedy pajączki tętnicze, rumień dłoni lub cechy kliniczne nadciśnienia wrotnego [2, 9, 12, 13]. NAFLD często towarzyszy takim chorobom, jak: otyłość, cukrzyca typu 2, hiperlipidemia i choroba trzewna, ekspozycji na różne leki i toksyny, a także zabiegom chirurgicznym leczenia otyłości (np. zespolenia jelitowo-jelitowe) [2, 7, 10]. NASH należy podejrzewać u chorego z miernie (zwykle 2–4-krotnie) podwyższoną aktywnością ALT i AST, SW w obrazie USG (zwiększona echogeniczność wątroby) i czynnikami ryzyka choroby (m.in. otyłość, cukrzyca typu 2, hiperlipidemia i nadciśnienie tętnicze) [2, 5, 7, 9].

**Tabela III.** Czynniki ryzyka rozwoju włóknienia i marskości wątroby w niealkoholowej tłuszczowej chorobie wątroby

**Table III.** Risk factors of fibrosis and liver cirrhosis in nonalcoholic fatty liver disease

Czynnik ryzyka	Wartość
wiek	45–50 lat
cukrzyca typu 2	obecna
nadciśnienie tętnicze	>140/90 mmHg lub leczone
BMI	mężczyzna >31,1 kg/m <sup>2</sup> , kobieta >32,3 kg/m <sup>2</sup>
ALT	>2 × górnej wartości normy
AST/ALT	>1
trójglicerydy	>1,7 mmol/l
zespół metaboliczny	obecne >3 cechy

*Zespół metaboliczny (>3 cechy): nietolerancja glukozy – glukoza na czczo >6,1 mmol/l, lub cukrzyca typu 2, otyłość trzewna z obwodem w talii >102 cm u mężczyzn i >88 cm u kobiet, nadciśnienie tętnicze >130/85 mm Hg lub leczone, hipertrójglicydemia >1,7 mmol/l lub stosowanie fibratów, niski poziom HDL: <1,0 mmol/l u mężczyzn i <1,3 mmol/l u kobiet [3].*

SW od NASH nie można rozróżnić na podstawie badania obrazowania wątroby (USG, KT, NMR) [2, 7].

Jeśli wykluczy się inne częste przyczyny wzrostu ALT i AST – w tym wywołane alkoholem lub lekami wirusowe zapalenie wątroby typu B i C, autoimmunologiczne zapalenie wątroby (ok. 25% chorych z NASH ma przeciwciała ANA w mianie poniżej 1:320), hemochromatozę (ok. 20–50% chorych z NASH ma podwyższoną ferrytynę), chorobę Wilsona, niedobór alfa1-antytrypsyny – to rozpoznanie NASH można uznać za pewne i nie jest konieczne wykonanie biopsji wątroby [2, 7]. Wykonanie biopsji wątroby zaleca się celem określenia zaawansowania uszkodzenia wątroby i prognozowania postępu NAFLD i NASH, nie ma jednak ścisłych wskazań do tego badania [2, 7, 9, 10, 12–15]. W badaniu histologicznym wycinka wątroby stwierdza się: stłuszczenie wielokropelkowe komórek wątrobowych, uszkodzenie hepatocytów w postaci zwyrodnienia balonowego, naciek zapalny złożony z limfocytów i granulocytów oraz ogniska rozsianej martwicy. W bardziej zaawansowanych przypadkach można zaobserwować włóknienie wokół żyły centralnej zrazika i zatok lub przestrzeni wrotnych (37–84% przypadków), marskość i ciątka Mallory'ego [2, 5, 15, 16]. Brunt i wsp. zaproponowali klasyfikację zmian histologicznych wątroby w NAFLD, stosowaną najczęściej w badaniach naukowych, która uwzględnia zaawansowanie zmian stłuszczeniowo-zapalnych (ang. *grading*) i włóknienie (ang. *staging*) [17]. Należy podkreślić, że zmiany histologiczne w NAFLD i NASH są

**Tabela IV.** Historia naturalna niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby i NASH [7, 8]

**Table IV.** Natural history of nonalcoholic fatty liver disease and NASH [7, 8]

	NAFLD	NASH
przebieg	łagodny	bardziej agresywny
rozwija się włóknienie	21% chorych	38% chorych
rozwija się marskość	3,4% chorych	25% chorych
rozwój HCC w marskości	25% chorych	25% chorych

Ryzyko rozwoju pierwotnego raka wątroby w marskości związanej z NAFLD wynosi 25%, podobne jak w marskości wywołanej HCV.

nie do odróżnienia od zmian w alkoholowej chorobie wątroby [2, 14, 16].

W oparciu o dotychczasową wiedzę można zaproponować następujące kryteria rozpoznania NASH [2, 3, 7]:

- nienadużywanie alkoholu w wywiadzie (dopuszczalne spożycie alkoholu poniżej 20 g/dobę przez kobiety i poniżej 40 g/dobę przez mężczyzn),
- badania laboratoryjne: zwiększona aktywność ALT i AST (wskaźnik de Ritis AST/ALT poniżej 1),

- badania obrazowe: cechy SW w USG, rzadziej wykonuje się badanie KT; NMR może ujawnić włóknienie, ale koszty badania są wysokie, a czułość metody mała,
- wykluczenie innych przyczyn SW i NASH, np. przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B lub C, autoimmunologicznego zapalenia wątroby i genetycznie uwarunkowanych chorób metabolicznych wątroby (choroba Wilsona, hemochromatoza).

Czynniki ryzyka progresji NAFLD i NASH oraz rozwoju włóknienia i marskości podano w tabeli III, a przebieg choroby na podstawie obserwacji trwających od roku do 15 lat przedstawiono w tabeli IV [7, 11, 15, 16].

## Leczenie

Jak dotąd nie ustalono zasad leczenia NAFLD z powodu nie do końca poznanej patogenezy tej choroby. Brak jest też kontrolowanych badań klinicznych i metaanaliz, przeprowadzono jedynie próby na małych liczebnych grupach. Wobec powyższego nie ustalono rekomendacji dotyczących terapii NAFLD i NASH [7].

NAFLD i NASH towarzyszą innym patologiom, które wymagają odrębnych metod terapii, stąd leczenie pole-

**Tabela V.** Leczenie niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby i NASH [2, 7, 8]

**Table V.** Treatment of nonalcoholic fatty liver disease and NASH [2, 7, 8]

<b>Unikanie hepatotoksyn, zaprzestanie przyjmowania leków i toksyn, unikanie alkoholu</b>
<b>redukcja masy ciała:</b>
dieta z ograniczeniem kalorii i aktywność fizyczna (spadek wagi 0,5–1 kg/tydz.)
dieta z ograniczeniem kalorii i leczenie farmakologiczne (zalecane, gdy dieta nieskuteczna i BMI >30 kg/m <sup>2</sup> )
zabiegi chirurgiczne (zalecane: BMI >35 kg/m <sup>2</sup> ; <i>by-pass</i> proksymalny żołądka, opaski żołądkowe; <i>by-pass</i> jelitowy powoduje progresję NASH – niezalecany)
<b>Zmniejszanie insulinooporności:</b>
metformina (najczęściej zalecana: otyłość i cukrzyca typu 2)
tiazolidinediony (troglitazon, rosiglitazon, pioglitazon) bez witaminy E lub z witaminą E
zmniejszanie ilości żelaza
<b>Leki przeciwlipidowe i hepatoprotekcyjne:</b>
gemfibrozil, statyny, kwas ursodeoksycholowy
<b>Leki przeciw nadciśnieniu tętniczemu:</b>
inhibitory ACE lub beta-blokery (zalecane: NAFLD z cukrzycą typu 2 i nadciśnieniem)
<b>Antyoksydanty:</b>
witamina E, betaina (metabolit choline), dysmutaza nadtlenkowa, N-acetylocysteina
<b>Leki hamujące tworzenie endotoksyn w jelicie cienkim i uwalnianie TNF-α z komórek Browicza-Kupffera (w trakcie badań)</b>
anty-TNF-α, probiotyki
<b>Mediatory zapalne (w trakcie badań):</b>
czynniki zwiększające adiponektynę, hamujące TNF-α, zmniejszające poziom leptyny
<b>Transplantacja wątroby:</b>
w marskości wątroby i raku pierwotnym wątroby, ale: nawroty NASH w przeszczepionej wątrobie u 50% po 4 latach

ga przede wszystkim na leczeniu choroby podstawowej [2, 4, 5, 7, 18]. I tak, w otyłości zalecana jest dieta niskokaloryczna, powodująca redukcję masy ciała (docelowo 0,5–1 kg/tydz. [4, 5, 7, 18], w cukrzycy – leczenie wyrównujące chorobę, w dyslipidemiach – leczenie przyczynowe ze statynami włącznie [19–21]. Obecne propozycje terapeutyczne dotyczące NAFLD i NASH przedstawiono w tabeli V [2, 5, 7, 18].

Ze względu na narastający problem otyłości i innych chorób metabolicznych w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie postępem wiedzy na temat NAFLD. Można więc przypuszczać, że lepsze poznanie etiopatogenezy tej choroby zaowocuje poznaniem nowych i bardziej skutecznych metod terapii NAFLD i NASH.

### Piśmiennictwo

- Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 (suppl. 1): S186-S190.
- Reid AE. Nonalcoholic fatty liver disease. W: Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ (wyd.). Saunders, Philadelphia 2006; 1793-1805.
- Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars Liver Dis* 1999; 19: 221-9.
- Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 2005; 330: 326-35.
- Neuschwander-Tetri BA. Fatty liver and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 193-8.
- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB i wsp. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-8.
- Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease. W: Evidence-based Gastroenterology and Hepatology. McDonald JWD, Burroughs AK, Feagan BG (wyd.). BMJ Books Blackwell Publishing, London 2004; 393-403.
- Lirussi F. The Cochrane Database of Systemic Reviews 2005, Issue 1. Art. No.: CD005165. [www.mrw.interscience.wiley.com/cochrane/clsysrev/articles/CD005165](http://www.mrw.interscience.wiley.com/cochrane/clsysrev/articles/CD005165).
- Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 960-7.
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two „hits”? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-5.
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-19.
- Mach T. Stłuszczeniowa choroba wątroby – patogeneza, obraz kliniczny i leczenie. Nowa Klinika. Gastroenterologia 2001; 10: 26-32.
- Mach T. Niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby. W: Choroby wewnętrzne. Szczeklik A (wyd.). Medycyna Praktyczna, Kraków 2005; 945-6.
- Mills SJ, Harrison SA. Comparison of the natural history of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7: 32-6.
- Ratzliff V, Poynard T. NASH: a hidden and silent fibrosis finally revealed? *J Hepatol* 2005; 45: 12-4.
- Adams LA, Sanderson S, Lindor KD i wsp. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005; 42: 132-8.
- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM i wsp. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2467-74.
- Athyros VG, Mikhailidis DP, Didangelos TP i wsp. Effect of multifactorial treatment on non-alcoholic fatty liver disease in metabolic syndrome: a randomized study. *Curr Med Res Opin* 2006; 22: 873-83.
- Gomez-Dominguez E, Gisbert JP, Moreno-Monteagudo JA i wsp. A pilot study of atorvastatin treatment in dyslipemid, non-alcoholic fatty liver patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1643-7.
- Kiyici M, Gulten M, Gurel S i wsp. Ursodeoxycholic acid and atorvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Can J Gastroenterol* 2003; 17: 713-8.
- Browning JD. Statins and hepatic steatosis: perspectives from the Dallas Heart Study. *Hepatology* 2006; 44: 466-71.